

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 19 APR 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 56 558.9

**Anmeldetag:** 04. Dezember 2002

**Anmelder/Inhaber:** SUPRAMOL™ Parenteral Colloids GmbH,  
Rosbach/DE

**Bezeichnung:** Ester von Polysaccharid Aldonsäuren, Verfahren  
zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung  
an pharmazeutische Wirkstoffe

**IPC:** C 08 B 31/16

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 17. Dezember 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Agurks

## **Zusammenfassung**

1. Ester von Polysaccharid Aldonsäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe.
  - 2.1 Bei der Kopplung von Polysaccharid-Derivaten wie z.B. Hydroxyethylstärke (HES) an pharmazeutische Wirkstoffe in wasserhaltigem Milieu treten Nachteile in Form von unerwünschten Nebenreaktionen auf. Es soll eine neue Methode zur Kopplung von Polysaccharid-Derivaten an pharmazeutische Wirkstoffe gefunden werden in wasserhaltigem Milieu bei der diese Nachteile nicht auftreten.
  - 2.2 Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass neue Polysaccharid-Aldonsäure-Ester gefunden wurden, mit welchen eine Kopplung der Polysaccharid Aldonsäuren an pharmazeutische Wirkstoffe im wässrigen Milieu ohne die beschriebenen Nachteile gelingt.
  - 2.3 Verbesserte Kopplungsmethode von Polysaccharid Aldonsäuren an pharmazeutische Wirkstoffe im wasserhaltigen Milieu.

## **Ester von Polysaccharid Säuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung zur Kopplung an pharmazeutische Wirkstoffe**

Die Konjugation von pharmazeutischen Wirkstoffen insbesondere von Proteinen mit Polyethylenglycol-Derivaten ("PEGylierung") oder Polysacchariden wie Dextrane oder insbesondere Hydroxyethylstärke ("HESylierung") hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen mit der Zunahme an pharmazeutischen Proteinen aus der biotechnologischen Forschung.

Oft haben solche Proteine eine zu kurze biologische Halbwertszeit, welche durch Kopplung an die oben angeführten Polymeren-Verbindungen wie PEG oder HES gezielt verlängert werden kann. Durch die Kopplung können aber auch die antigenen Eigenschaften von Proteinen positiv beeinflusst werden. Im Falle von anderen pharmazeutischen Wirkstoffen kann durch die Kopplung die Wasserlöslichkeit erheblich vergrößert werden.

HES ist das hydroxethylierte Derivat des in Wachsmaisstärke zu über 95 % vorkommenden Glucosepolymers Amylopektin. Amylopektin besteht aus Glucoseeinheiten, die in  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen vorliegen und  $\alpha$ -1,6-glykosidische Verzweigungen aufweisen. HES weist vorteilhafte rheologische Eigenschaften auf und wird zur Zeit als Volumenersatzmittel und zur Hämodilutionstherapie klinisch eingesetzt (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, Vol. 8 (8, 1987) Seite 271 – 278 und Weidler et. al., Arzneimittelforschung / Drug Res., 41, (1991) Seite 494 – 498).

HES wird im wesentlichen über das gewichtsgemittelte mittlere Molekulargewicht  $M_w$ , das Zahlenmittel des mittleren Molekulargewichts  $M_n$ , die Molekulargewichtsverteilung und den Substitutionsgrad gekennzeichnet. Die Substitution mit Hydroxyethylgruppen in Ätherbindung ist dabei an den Kohlenstoffatomen 2, 3 und 6 der Anhydroglucoseeinheiten möglich. Der Substitutionsgrad kann dabei als DS ("degree of substitution"), welcher auf den Anteil der substituierten Glucosemoleküle aller Glucoseeinheiten Bezug nimmt, oder als MS ("molar substitution") beschrieben werden, womit die mittlere Anzahl von Hydroxyethylgruppen pro Glucoseeinheit bezeichnet wird.

In DE 196 28 705 und DE 101 29 369 werden Verfahren beschrieben, wie die Kopplung mit Hydroxyethylstärke in wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) über das entsprechende Aldonsäurelacton der Hydroxyethylstärke durchgeführt werden kann mit freien Aminogruppen von Hämoglobin bzw. Amphotericin B.

Da in wasserfreien, aprotischen Lösungsmitteln gerade im Falle der Proteine oft nicht gearbeitet werden kann, entweder aus Löslichkeitsgründen aber auch Gründen der Denaturierung der Proteine, stehen auch Kopplungsverfahren mit HES im wasserhaltigen Milieu zur Verfügung. Z.B. gelingt die Kopplung der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Hydroxyethylstärke durch Vermittlung von wasserlöslichem Carbodiimid EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) (PCT/EP 02/02928). Sehr oft jedoch ist der Einsatz von Carbodiimiden mit Nachteilen behaftet, da Carbodiimide sehr häufig inter- oder intramolekulare Vernetzungsreaktionen der Proteine verursachen als Nebenreaktionen.

Im Falle von phosphatgruppenhaltigen Verbindungen wie Nukleinsäuren gelingt die Kopplung oft gar nicht, da die Phosphatgruppen mit EDC ebenfalls reagieren können (S.S. Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, CRC-Press, Boca Raton, London, New York, Washington D.C., 1993, Seite 199).

Es bestand daher die Aufgabe, solche aktivierten Derivate von Hydroxyethylstärke oder anderen Polysacchariden zu finden, die in rein wässrigen Systemen oder auch in Lösungsmittelgemischen mit Wasser die Kopplung an Proteine oder andere Wirkstoffe gezielt ermöglichen, ohne die oben beschriebenen Nachteile aufzuweisen.

Es wurde nun überraschender Weise gefunden, dass aus den am reduzierenden Kettenende selektiv zu den Aldonsäuren oxidierten Hydroxyethylstärken sowie anderen Polysacchariden wie z.B. Wachsmaisstärke-Abbaufractionen in trockenem aprotischem Lösungsmittel wie Dimethylacetamid (DMA) oder Dimethylformamid (DMF) azide Alkohole wie N-Hydroxy-Succinimide zum entsprechenden Ester hergestellt werden konnten. Solche Ester können als aktivierte Säuren aufgefasst werden. Sie setzen sich im wässrigen Milieu mit

nukleophilen  $\text{NH}_2$ -Gruppen zu (stabileren) Amiden um. Als Nebenreaktion tritt eine Verseifung mit Wasser auf zur freien Säure und zum freien Alkohol.

Die Umsetzung mit HES-Aldonsäuren, z.B. mit N-Hydroxy-Succinimid gelingt in trockenem DMA unter Wasserausschluss mit EDC in glatter Reaktion bei Raumtemperatur zum HES-Säure-N-Hydroxy-Succinimid-Ester. Dabei ist insbesondere überraschend, dass keine Nebenreaktion der HES-Moleküle eintritt über die Reaktion der im extremen Überschuß vorliegenden OH-Gruppen der Anhydroglucosen mit EDC sowie die Umlagerungsreaktion des primär gebildeten O-Acyl-Isoharnstoffs aus EDC und der Aldonsäure zum entsprechenden N-Acyl-Harnstoff unterdrückt wird.

Die HES-Aldonsäure-Ester können aus der Lösung in DMA durch trockenes Ethanol, Isopropanol oder Aceton gefällt und durch mehrfaches wiederholen des Vorganges gereinigt werden. Solche HES-Säure-Ester können dann in Substanz isoliert zur HESylierung verwendet werden. Dabei treten dann keine Nebenreaktionen wie oben beschreiben mit EDC-aktivierter Säure auf.

Weitere geeignete acide Alkohole zur Herstellung der HES oder HES-Säure-Aldonsäure-Ester sind in der Literatur aufgeführt. (V.H.L. Lee. Ed. Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, 1991, S. 65).

Vorteilhafterweise kann z.B. auch das sulfonierte N-Hydroxysuccinimid eingesetzt werden oder aber auch Phenolderivate. Ebenfalls kann vorteilhaft N-Hydroxy-Benzotriazol als Alkohol-Komponente verwendet werden.

Als Aldonsäure-Komponente können geeignete Hydroxyethylstärke-Fraktionen, die selektiv am reduzierenden Kettenende zur entsprechenden Aldonsäure gemäß dem Stand der Technik oxidiert worden sind, eingesetzt werden aber auch andere Stärkederivate wie z.B. Hydroxypropylstärke. Ebenfalls kommen infrage die in der deutschen Patentanmeldung 102 17 994 beschriebenen hypervverzweigten Stärkefraktionen.

## Beispiele

### Beispiel 1

#### Herstellung von HES 10/0,4 – Säureester mit N-Hydroxy-Succinimid

5 g getrocknete, am terminalen reduzierenden Kettenende selektiv nach DE 196 28 705 oxidierte Hydroxyethylstärke mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_w = 10.000$  Dalton und einem Substitutionsgrad  $MS = 0,4$  werden in 30 ml trockenem Dimethylacetamid bei  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelöst und nach Abkühlen der Lösung mit der 10fachen molaren Mengen N-Hydroxy-Succinimid versetzt unter Feuchtigkeitsausschluß. Danach wird die zur HES-Säure äquimolare Menge EDC portionsweise zugegeben und 24 Stunden nach Zugabe der Reaktionsansatz ausreagieren gelassen. Das Reaktionsprodukt wird anschließend mit trockenem Aceton gefällt und zur Reinigung mehrfach umgefällt.

### Beispiel 2

#### Herstellung von Hes 10/0,4 – Säure gekoppeltem Myoglobin

15 mg Myoglobin werden in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge auf 7,5 eingestellt. Zu der Lösung werden 1,5 g HES 10/0,4 – Säure N-Hydroxy-Succinimid, hergestellt nach Beispiel 1, über 1 Stunde portionsweise zugegeben und der pH-Wert konstant bei 7,5 gehalten durch Zugabe von Natronlauge.

Der Ansatz wird über Nacht rühren gelassen.

Die Bildung von hesyliertem Myoglobin wird über Gel-Permeationschromatographie mit einer Ausbeute von 70 %, bezogen auf das eingesetzt Myoglobin, bestimmt.

## Patentansprüche

1. Aldonsäure-Ester von selektiv am reduzierenden Kettenende zu Aldonsäuren oxidierten Stärkefraktionen oder Stärkefraktions-Derivaten.
2. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktionen Abbaufractionen des Amylopektins sind.
3. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 2, wobei die Abbaufractionen des Amylopektins durch Säureabbau und/oder Abbau durch  $\alpha$ -Amylase von Wachsmaisstärke gewonnen werden.
4. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 3, wobei die Stärkefraktionen ein mittleres Molekulargewicht  $M_w$  von 2.000 – 50.000 Dalton aufweisen und eine mittlere Verzweigung von 5 – 15 mol%  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen.
5. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 1, wobei die Stärkefraktions-Derivate Hydroxyethyl-Derivate von Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind.
6. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 5, wobei das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  der Hydroxyethylstärke-Fractionen im Bereich von 2 – 300.000 Dalton liegt und der Substitutionsgrad MS zwischen 0,1 und 0,8 liegt sowie das C2/C6-Verhältnis der Substituenten an den Kohlenstoffatomen C2 und C6 der Anhydroglucosen zwischen 2 und 15 liegt.

7. Aldonsäure-Ester gemäß Ansprüchen 1-6, wobei die Alkoholkomponente N-Hydroxy-Succinimid, Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole oder Hydroxy-Benzotriazol ist.
8. Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 1-6, wobei die Alkoholkomponente N-Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid ist
9. Verfahren zur Herstellung von Aldonsäure-Ester gemäß Anspruch 1-8 dadurch gekennzeichnet, dass die wasserfreien Aldonsäuren bzw. Aldonsäure-Lactone in wasserfreien aprotischen Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO), N-Methylpyrrolidon, Dimethylacetamid (DMA) oder Dimethylformamid (DMF) gelöst werden, gegebenenfalls unter Wärme, dem Ansatz in 5- bis 50-fachem Überschuß die Alkoholkomponente und sodann portionsweise EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) in 1- bis 3-molarem Überschuß zur Aldonsäure zugegeben werden und dann den Ansatz 24 Stunden bei Raumtemperatur ausreagieren lässt.
10. Verfahren zur Herstellung von mit Polysacchariden oder Polysaccharid-Derivaten an an freien Aminofunktionen gekoppelten pharmazeutischen Wirkstoffen dadurch gekennzeichnet, dass Ester der am reduzierenden Kettenende selektiv zur Aldonsäure oxidierten Polysaccharide bzw. Polysaccharid-Derivate damit umgesetzt werden unter Ausbildung von stabilen Amidbindungen.
11. Verfahren nach Anspruch 10 dadurch gekennzeichnet, dass die Ester Ester von N-Hydroxy-Succinimid, Sulfo-N-Hydroxysuccinimid, substituierte Phenole oder Hydroxy-Benzotriazol sind.
12. Verfahren nach Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, dass die Ester Ester von Hydroxy-Succinimid und Sulfo-N-Hydroxysuccinimid sind.



13. Verfahren nach Ansprüchen 10, 11 und 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Polysaccharide Abbaufractionen der Wachsmaisstärke sind und ihrer Hydroxyethyl-Derivate.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**